

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 54110389
PUBLICATION DATE : 29-08-79

APPLICATION DATE : 20-02-78
APPLICATION NUMBER : 53017583

APPLICANT : KAWAMURA INST OF CHEM RES;

INVENTOR : MATSUBAYASHI TADAO;

INT.CL : C12D 3/02 C12D 13/10

TITLE : PREPARATION OF COENZYME Q10

ABSTRACT : PURPOSE: To prepare coenzyme Q₁₀ in high yield, from the cells obtained by culturing microorganisms belonging to Protaminobacter genus in a medium containing methanol as a carbon source.

CONSTITUTION: Methanol-assimilable, coenzyme Q₁₀-producing, pref. carotenoid-producing bacteria belonging to Protaminobacter genus, e.g. Protaminobacter ruber ATCC 8457, BM-2 (FERM-P No.4308), are cultured in a nutrient medium containing methanol as a carbon source in an aerated and agitated deep-tank fermentor at 20-37°C, pref. 28-32°C and pH-5-9, pref. about 7 for 1-7 days. The amount of the methanol in the medium is pref. 0.1-5.0 V/V %. The cultured cells are saponified with alkali, extracted with a solvent, and purified by silica gel chromatography, etc. to obtain the objective coenzyme Q₁₀.

COPYRIGHT: (C)1979,JPO&Japio

⑨日本国特許庁(JP)

⑩特許出願公開

⑪公開特許公報(A)

昭54-110389

⑫Int. Cl.⁸ 識別記号 ⑬日本分類 ⑭庁内整理番号 ⑮公開 昭和54年(1979)8月29日
C 12 D 3/02 36(2) D 33 7822-4B
C 12 D 13/10 36(2) C 04 7421-4B 発明の数 1
審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑯コエンチーム Q₁₀ の製造法

⑰発明者 松林忠男

千葉市小仲台 4-3-18

⑱特 願 昭53-17583

⑲出 願 人 大日本インキ化学工業株式会社

⑳出 願 昭53(1978)2月20日

東京都板橋区坂下三丁目35番58号

㉑発明者 鈴木康介

同

財団法人川村理化学研究所

春日部市道口蛭田162-42

浦和市上木崎2丁目7番8号

渡辺輝夫

浦和市上木崎2-7-32

明 細 書

1. 発明の名称

コエンチーム Q₁₀ の製造法

2. 特許請求の範囲

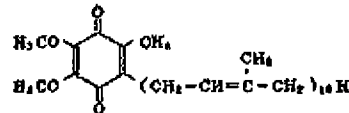
1. プロパミノバクター属に属し、メタノールを酸化することができコエンチーム Q₁₀ 生産菌を、メタノールを炭素源とする培地に培養し、菌体中へコエンチーム Q₁₀ を蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする微生物によるコエンチーム Q₁₀ の製造法。

2. プロパミノバクター属に属し、メタノールを酸化することができコエンチーム Q₁₀ 生産菌が、コロナイッド生産菌である特許請求の範囲第1項記載のコエンチーム Q₁₀ の製造法。

3. 発明の詳細な説明

コエンチーム Q₁₀ は、下記の式で示されるキノン核の6

位のイソプレノ側鎖を有する6-ジメトキシ-5-メチル-1,4-ベンゾキノンでイソプレノ側鎖の数が10個の化合物である。



コエンチーム Q₁₀ は、生体内における電子伝達系の必須成分として、極めて重要な役割を果している。

医薬品としても心臓薬として近年需要が急増しており、将来性が期待されている。本物質は、その他の各種疾病に対しても優れた薬理作用を示す臨床例が報告されている。即ち、肝臓障害、筋弱症、糖及び脂肪酸の代謝異常、脳血管障害等の病的状態での投与効果が認められている。

従来、微生物によるコエンチーム Q₁₀ の製造法としては、紅色光合成細菌であるロドスピリウム・カプシムラタによる法(特許第48-21519号)、ロドスピリウム・

クリプトコッカス、ヌガロガコマイモスに属する菌種による法（特公第48-8836）等があるが、これ等は増殖が極めて遅いか又は、コエンザームQ₁₀の生成量が極めて低く、工業化は困難である。

本発明者らは、微生物を培養してコエンザームQ₁₀を製造するために広範囲にわたりコエンザームQ₁₀生産菌について検索を行なった結果、プロトミノバクター属に属し、メタノールを酸化することができる細菌がコエンザームQ₁₀の高い生産性を有していることを見出し、本発明に到達した。

本発明は、プロトミノバクター属に属し、メタノールを酸化することができるコエンザームQ₁₀生産菌をメタノールを炭素源とする培地に培養し、懸液中へコエンザームQ₁₀を濃縮せしめ、これを採収することを特徴とする微生物によるコエンザームQ₁₀の製造法に関するものである。

特開昭54-110389(2)

本発明に依れば、コエンザームQ₁₀を効率的に調製することができる。

また、本発明に於いて炭素源として使用されるメタノールは、工業的に安価にして大量に供給可能であり、難燃系炭素源よりも将来性が期待されているものである。

本発明に於いて使用する微生物としては、プロトミノバクター属に属し、メタノールを酸化することができるコエンザームQ₁₀生産菌であればすべてを使用することができるが、特にカロチノイド生産菌が好ましく、例えばプロトミノバクター・ルーパーATCC-8487並びに本発明者らが自然界より分離した野生株P-1を挙げることができる。

野生株P-1の菌学的性質を示すと、次の通りである。

- 6 -

- 4 -

菌株P-1の形態

| 培養条件 | 観察項目 | 野生株 P-1 |
|-------------------------------------|--------|---------------------|
| メタノールを含む有酸素培地及び無酸素培地にて、30℃、4日間培養した。 | 菌体の形 | 球 形 |
| | 菌体の大きさ | 0.4~0.8μm×1.0~2.5μm |
| | 多 数 性 | な し |
| | 運動 性 | 運動性あり、鞭毛 |
| | 増殖形式 | な し |
| | 菌体染色 | 陰 性 |
| | 抗 酸 性 | 陰 性 |

野生株 7-1 は、菌学的性質がバーグズ・マニユア
ル・オブ・デターミナティブ・バクテリオロジー

(Bergey's of Determinative Bacteriology)

第7版、第201頁～第202頁に記載されているプロタ
ミノバクテリウム・ルーバーの菌学的性質とほぼ一致するが、

炭素源の変化性においていくつか性質が異なるため、新菌
株であると断定し、プロタミノバクテリウム・ルーバー

(*Protaminobacter ruber*) BM-2 と命名した。

このプロタミノバクテリウム・ルーバー (*Protaminobacter
ruber*) BM-2 は、工業技術院微生物工業技術研究所に
昭和52年11月25日付けで農工研受託番号農工研菌寄
第4808号として寄託されている。

本菌明においては、メタノールを炭素源として、これに
窒素源、燐源、加里源、その他の無機塩及び各種ビタミン
類あるいは、これらを含有する酵母エキス、ペプトン、コ

- 8 -

1日～5日間連続培養増殖する。培養液からは、常法
により遠心分離又は戸過法等により集菌する。

かくして得られた培養菌体中よりコエンザイム Q_{10} を抽
出分離する場合の一例を示すと、菌体濃縮物(乾燥菌体
10～20重量%)へメタノール、水酸化ナトリウム、抗
酸化剤としてビロロールを添加し、50～90℃にて
30～120分間連続加熱する。次いで冷却後 n -ヘキサ
ン等の溶媒で抽出し、密閉層を水洗脱後、窒素気流下に
て濃縮する。この濃縮物をシリカゲル、アルミナ、フロリ
ジル等のカラムに添加し、次いで n -ヘキサン、クロロホ
ルム、ベンゼン等の有機溶媒にて展開すると、コエンザイ
ム Q_{10} が溶出する。

コエンザイム Q_{10} 抽出成分を再び窒素気流下濃縮乾燥す
ると、精製コエンザイム Q_{10} を得ることが出来る。このよ
うにして得られた精製コエンザイム Q_{10} は、紫外吸収スペ

特開昭54-110389(4)

ーンスターブライカー、カルボキス等を添加した培養液に用
いられる。

培地中のメタノール濃度は、0.1～5.0%(V/V)

が好ましい。

本菌明において使用する培地の1具体例として

メタノール 10ml、 $NH_4H_2PO_4$ 2.0g、 KH_2PO_4 2.0g、

$NaNO_3$ 2.0g、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 3.0g、

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.01g、

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g、 $MnSO_4 \cdot xH_2O$ 0.05g、

$CoSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001g、酵母エキス 0.1g、水道水

1000ml (pH 7.0) の組成の培地が挙げられる。但し、

これは1具体例であつて炭素源としては、無機以外の有機
炭素源を使用することも出来る。

上記のような培地に菌体を接種し、pH 5～9 好ましく
は7、温度20～37℃好ましくは26℃～32℃で、

- 9 -

クトル、紫外吸収スペクトル、核磁気共鳴吸収スペクトル
及び薄層展開クロマトグラフィーにより定性した結果、標
準試薬コエンザイム Q_{10} (シグマ Co. Ltd.) と一致した。

次に本菌明の実施例を示すが、これらは単なる一例であ
り、本菌明はこれに限定されるものではない。

実施例1

$NH_4H_2PO_4$ 2g、 $NaNO_3$ 2g、 KH_2PO_4 2g、

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 3g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g、

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.01g、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005g、

$MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.005g、 $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001g、

酵母エキス 0.1g、水道水 1000ml の組成の培地 (pH 7.0)

4g を10.4リットルフラスコに入れ、120℃、

15分間加熱殺菌後培養温度30℃、通気量2.0/min に

設定し、メタノール5.0ml (4.0g) を加える。

次いで、前記組成の培地にメタノールを1%(V/V)

加えた培養100mlづつを仕込んだ培養フラスコ2本を用いて、2日間前培養したプロトノバクター・ルーバーATCC-3457を接種し、攪拌機800r.p.m.にて培養する。培養2日間行なつた後、遠心分離により集菌して菌体乾燥物(乾燥菌体として1.5g)を得た。

この菌体には、フォルカーらの方法(Folker's Archives of Biochemistry and Biophysics) 第97巻、第298号(1960年)により定量したところ、乾燥菌体100g当り112mgのコエンザイム Q_{10} が含まれていた。

得られた菌体乾燥物をメタノール350ml、ピロガロール5g、水酸化ナトリウム20gを加え、85℃にて1時間還流加熱した。冷却後200mlのn-ヘキサンを加えて2回抽出を繰り返えし、n-ヘキサン層を回収する。

- 12 -

たところ、乾燥菌体100g当り144mgのコエンザイム Q_{10} が含まれていた。

得られた菌体乾燥物を奨励例1と同一の処理を行なつたところ、橙黄色板状結晶1.5gが得られた。菌体乾燥物100g当り60.7mgのコエンザイム Q_{10} が得られたことになる。

寄附出願人 大日本イソキ化学工業株式会社
附随出人 川村 善化学研究所

特開昭54-110389(5)

n-ヘキサンを水洗後、無水エタノールで脱水し、真空乾燥下減圧乾燥乾燥した。残渣をn-ヘキサン5mlにて溶解し、フロリジンを乾燥剤とするクロマト管(26×750mm)に充填し、展開溶媒として順次n-ヘキサンの、クロロホルム(4:1)の混合溶媒を流してゆくと、コエンザイム Q_{10} が分離溶出する。溶出液を再び真空乾燥下減圧乾燥乾燥し、残渣を10mlのエタノールに溶解し、0℃にて1昼夜冷却すると橙黄色板状結晶6.6mgが得られた。乾燥菌体100g当り49.1mgのコエンザイム Q_{10} が得られたことになる。

奨励例2

奨励例1と同一の増殖組成及び培養条件によりプロトノバクター・ルーバーBM-2(微生物研究第4306号)を培養し、菌体乾燥物6.2g(乾燥菌体として11.7g)を得た。この菌体には、フォルカーらの方法により定量し

- 13 -